

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner
US Department of Commerce
United States Patent and Trademark
Office, PCT
2011 South Clark Place Room
CP2/5C24
Arlington, VA 22202
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year)

03 April 2001 (03.04.01)

International application No.

PCT/CN00/00205

Applicant's or agent's file reference

PCTIC0036CN

International filing date (day/month/year)

19 July 2000 (19.07.00)

Priority date (day/month/year)

19 July 1999 (19.07.99)

Applicant

QI, Qing et al

1. The designated Office is hereby notified of its election made:



in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

13 February 2001 (13.02.01)



in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election



was



was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer

S. Mafla

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

nu 10103152.0

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

RECEIVED

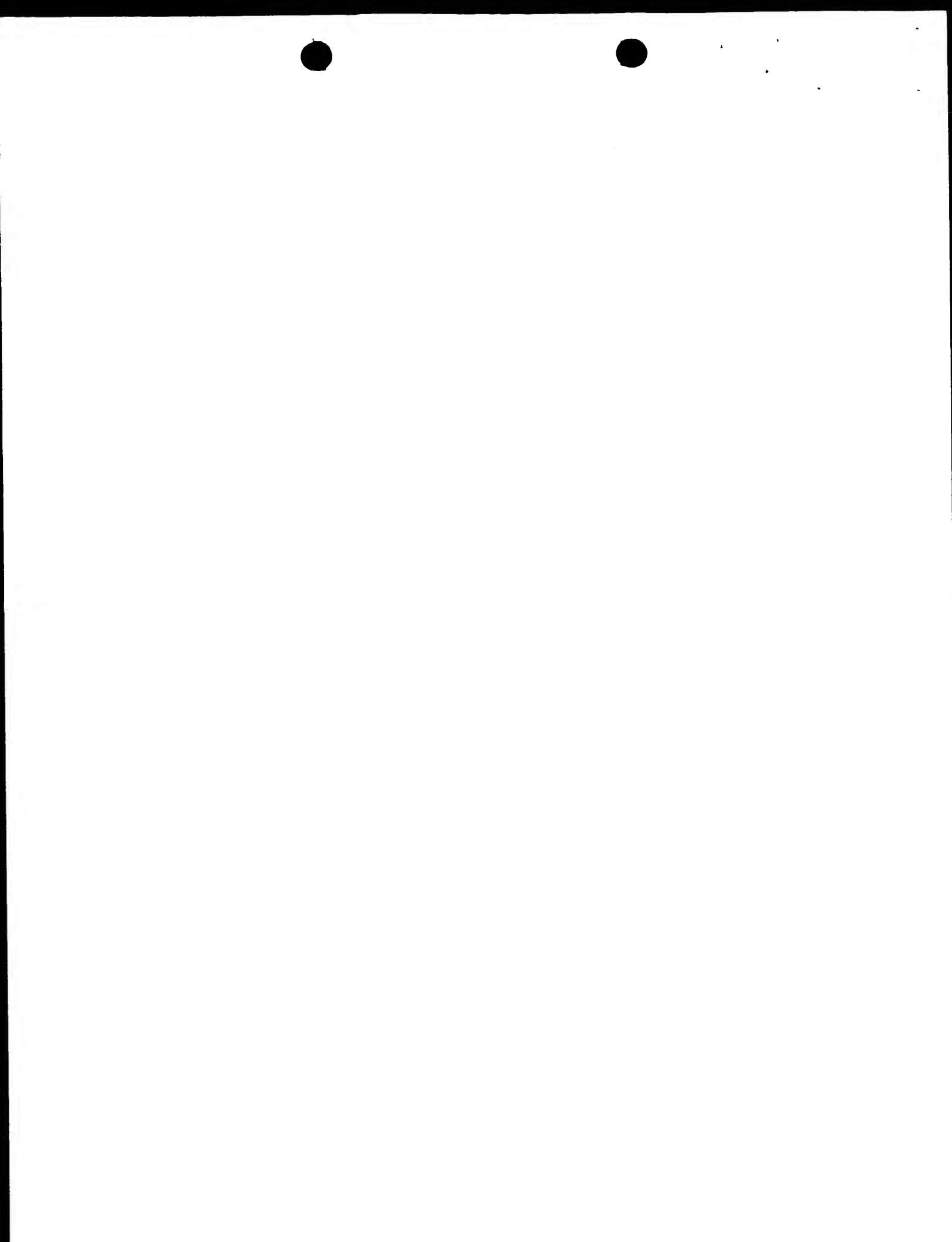
MAY 31 2002

REC'D
TECH CENTER 1600/2900
DEC 2001

WIPG

PCT

Applicant's or agent's file reference PCTIC0036CN		FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/CN00/00205	International filing date (day/month/year) 19.Jul.2000 (19.07.00)	Priority date (day/month/year) 19.Jul.1999 (19.07.99)	
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC IPC (7) : A61K35/78			
Applicant QI, Qing et al			
<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>3</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and /or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of _____ sheets.</p>			
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input type="checkbox"/> priority</p> <p>III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty ,inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2)with regard to novelty ,inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application.</p>			
Date of submission of the demand 13.Feb.2001 (13.02.01)		Date of completion of this report 15.Nov.2001 (15.11.01)	
Name and mailing address of the IPEA/CN 6 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, 100088 Beijing, China Facsimile No. 86-10-62019451		Authorized officer YU, ZHAI Telephone No.86-010-62093734	



I. Basis of the report

1. With regard to the elements of the international application:*

☒ the international application as originally filed☐ the description:

pages _____, as originally filed

pages _____, filed with the demand

pages _____, filed with the letter of _____

☐ the claims:

Nos _____, as originally file

Nos _____, as amended (together with any statement) under Article 19

Nos _____, filed with the demand

Nos _____, filed with the letter of _____

☐ the drawings:

sheets/fig _____, as originally filed

sheets/fig _____, filed with the demand

sheets/fig _____, filed with the letter of _____

☐ the sequence listing part of the description:

pages _____, as originally filed

pages _____, filed with the demand

pages _____, filed with the letter of _____

2. with regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rules 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

☐ contained in the international application in written form.☐ filed together with the international application in computer readable form.☐ furnished subsequently to this Authority in written form.☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:☐ the description, pages _____☐ the claims No. _____☐ the drawings, sheets/fig _____5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rules 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item I and annexed to this report.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/CN00/00205

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement:

Novelty (N)	Claims <u>1-56</u>	YES
	Claims _____	NO
Inventive step (IS)	Claims <u>1-56</u>	YES
	Claims _____	NO
Industrial applicability (IA)	Claims <u>1-56</u>	YES
	Claims _____	NO

2. Citations and explanations (Rule 70.7)

About Industrial Application

The anti-cancer pharmaceutical composition containing algae protein polysaccharide extracts described in Claim 1-56 can be used in the industry. So Claim 1-56 possess industrial applicability according to PCT Article 33 (4) .

About Novelty

The technical Solutions described in the documents in the international search report are not same as the technical solutions in Claim 1-56. So Claim 1-56 possess novelty according to PCT Article 33 (2) .

About Inventive Step

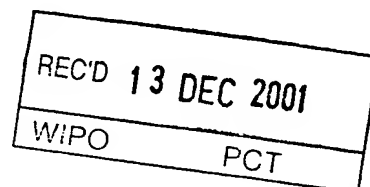
The technical Solutions described in the documents in the international search report are not related to the technical solutions in Claim 1-56. So Claim 1-56 possess inventive step according to PCT Article 33 (3) .



专 利 合 作 条 约

PCT

国际初步审查报告
(PCT 条约 36 和细则 70)



申请人或代理人的档案号 PCTIC0036CN	关于后续行为 参见“传送国际初步审查报告的通知”(PCT/IPEA/416 表)	
国际申请号 PCT/CN00/00205	国际申请日(日/月/年) 19.7 月 2000 (19.07.00)	优先权日(日/月/年) 19.7 月 1999 (19.07.99)
国际专利分类(IPC)或者国家分类和 IPC 两种分类 IPC (7): A61K35/78		
申请人 齐清 等		

1. 本国际初步审查单位已作出国际初步审查报告并依照条约第 36 条将其传送给申请人。

2. 本报告共计3页, 包括扉页。

☐ 本报告还有附件, 即修改后的并且作为本报告基础的说明书修改页、权利要求书修改页和/或附图修改页, 和/或对本国际初步审查单位所作出的更正页(见 PCT 细则 70.16 和行政规程 607)。

这些附件共计——页

3. 本报告包括关于下列各项的内容:

- I ☒ 报告的基础
- II ☐ 优先权
- III ☐ 不出关于新颖性、创造性和工业实用性的意见
- IV ☐ 缺乏发明的单一性
- V ☒ 按条约 35(2)关于新颖性、创造性或工业实用性的推断性意见; 支持这种意见的引证和解释
- VI ☐ 引用的某些文件
- VII ☐ 国际申请中的某些缺陷
- VIII ☐ 对国际申请的某些意见

提交要求书的日期 13.2 月 2001 (13.02.01)	完成本报告的日期 15.11 月 2001 (15.11.01)
国际初步审查单位名称和地址 IPEA/CN 中国北京市海淀区西土城路 6 号(100088) 传真号: 86-10-62019451	授权官员 翟羽 电话号码: 86-010-62093734

I. 报告的基础

1. 关于国际申请中各个部分: *

☒ 原始提交的国际申请。

- ☐ 说明书, 第_____页, 原始提交的,
第_____页, 要求书提交的,
第_____页, _____的信件提交的。
- ☐ 权利要求, 第_____页, 始提交的,
第_____页, 条约第 19 条修理工改的(附有说明),
第_____页, 要求书提交的。
第_____页, _____的信件提交的。
- ☐ 附图, 第_____页, 原始提交的。
第_____页, 随要求书提交的,
第_____页, _____的信件提交的。
- ☐ 说明书中的序列列表部分
第_____页, 原始要求提交的,
第_____页, 随要求书提交的,
第_____页, _____的信件提交的。

2. 关于所使用的语言, 除本项下另有说明外, 本国际初步审查单位所获得的或者已向本国际初步审查单位提交的上述所有部分, 所使用的语言均为提交本国际申请时所使用的语言。

本国际初步审查单位所获得的或向本国际初步审查单位提交的这些部分所使用的语言是 _____, 这种语言是

- ☐ 为了国际检索而提交的译本所使用的语言(细则 23.1 (b))。
- ☐ 本国际申请公布时所使用的语言(细则 48.3 (b))。
- ☐ 为了国际初步审查而提交的译本所使用的语言(细则 55.2 和/或 55.3)。

3. 关于本国际申请中所公开的任何核甞酸和/或氨基酸的序列, 本国际初步审查是根据下面的序列列表进行的:

- ☐ 国际申请中所包含的书写形式的序列列表。
- ☐ 与国际申请同时提交的计算机可读形式的序列列表。
- ☐ 后来以书写形式向本国际初步审查单位提交的序列列表。
- ☐ 后来以计算机可读的形式向本国际初步审查单位提交的序列列表。
- ☐ 已提交了关于后来提交的书写形式的序列列表没有超出原始提交的国际申请所公开的范围的说明。
- ☐ 已提交了关于以计算机可读的形式记载的信息是与书写形式的序列列表相同的说明。

4. 修改删除了以下内容的:

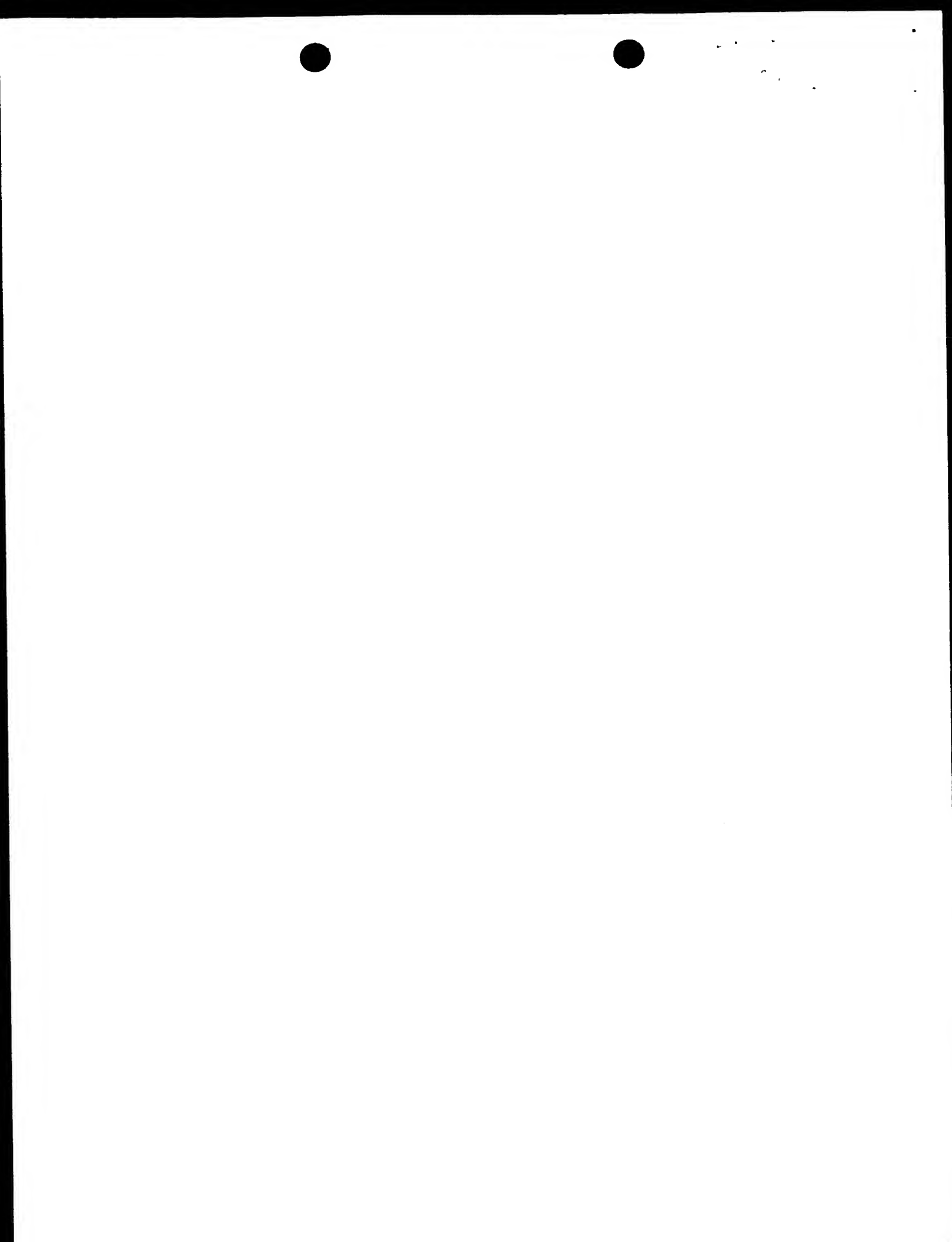
- ☐ 说明书, 第_____页
- ☐ 权利要求, 第_____项
- ☐ 附图, 第_____页, 图_____

5. ☐ 由于(某些)修改被认为超出了原始公开的范围, 如补充栏所示, 因此本报告是按照如同没有修改的情况作

出的(细则 70.2(c)). **

* 按照条约第 14 条答复通知时向受理局提交的替换页, 在本报告中被称为“原始提交的”, 这些替换页不作为本报告的附件, 因为它们没有包含修改(细则 70.16 和 70.17)。

** 任何包含这种修改的替换页, 都必须在第 1 项中指出, 并作为本报告的附件。



国际初步审查报告

国际申请号

PCT/CN00/00205

V. 按条约 35 条(2)关于新颖性、创造性或工业实用性的推断性意见；支持这种意见的引证和解释

1. 意见

新颖性(N)	权利要求 1—56	是
	权利要求	否
创造性(IS)	权利要求 1—56	是
	权利要求	否
工业实用性(IA)	权利要求 1—56	是
	权利要求	否

2. 引证和解释（细则 70.7）

关于工业实用性

权利要求 1—56 所述的技术方案为含有藻蛋白多糖提取物的抗癌药物组合物，在制药工业上能够实施，因此，权利要求 1—56 具有工业实用性，符合 PCT 第 33（4）条关于工业实用性的规定。

关于新颖性

权利要求 1—56 所述的技术方案与国际检索报告中所列对比文献所述的技术方案都不相同，所以，权利要求 1—56 具有新颖性，符合 PCT 第 33（2）条关于新颖性的规定。

关于创造性

权利要求 1—56 所述的技术方案与国际检索报告中所列对比文献所述的技术方案都不相关，所以，权利要求 1—56 具有创造性，符合 PCT 第 33（3）条关于创造性的规定。

(19) 世界知识产权组织
国际局



(43) 国际公布日:
2001年1月25日(25.01.01)

PCT

(10) 国际公布号:
WO 01/05414 A1

(51) 国际分类号⁷: A61K 35/78, 31/715, A61P 35/00, 7/00, 31/12, 37/02, 43/00

(21) 国际申请号: PCT/CN00/00205

(22) 国际申请日: 2000年7月19日(19.07.00)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
99109881.1 1999年7月19日(19.07.99) CN

(71)(72) 发明人/申请人: 齐清(QI, Qing) [CN/CN]; 中国北京市地安门东大街93号, Beijing 100009 (CN)。丁健(DING, Jian) [CN/CN]; 中国上海市冠生园路科苑新村10号1005室, Shanghai 200233 (CN)。

(74) 代理人: 中原信达知识产权代理有限责任公司
(CHINA SINDA INTELLECTUAL PROPERTY LTD.); 中国北京市朝阳区建国路99号中服大厦1300室, Beijing 100020 (CN)。

(81) 指定国(国家): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(84) 指定国(地区): ARIPO专利(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), 欧亚专利(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲专利(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI专利(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

本国际公布:
— 包括国际检索报告。

所引用双字母代码和其它缩写符号, 请参考刊登在每期PCT公报期刊起始的“代码及缩写符号简要说明”。

(54) Title: ALGAE PROTEIN POLYSACCHARIDE EXTRACTION AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 藻蛋白多糖的提取及其应用

(57) Abstract: The present invention provides a pharmaceutical composition containing algae protein polysaccharide extracts, and a method for preparing algae protein polysaccharide extracts.

(57) 摘要

本发明提供了含藻蛋白多糖提取物的药物组合物, 以及藻蛋白多糖提取物的制备方法。



藻蛋白多糖的提取及其应用

本发明领域

5 本发明涉及藻类生物体的提取物及其应用，特别是藻蛋白多糖的提取和应用。

本发明技术背景

10 七十年代以来，人们对藻类生物特别是蓝绿藻的研究日渐重视，起初，人们对藻类的研究主要集于其营养价值和毒性方面。在 1974 年召开的联合国粮农组织会议上，螺旋藻就被认为是人类未来优秀食品资源。

15 然而对藻类生物的药物作用的认识则始于八十年代，人们主要集中在研究各种藻类提取物的性能，在这些研究中，蓝绿藻类提取物，特别是螺旋藻的提取物的研究尤其引人注目。

 在日本特许公开昭和 58-12832 中，报道了从小球藻及螺旋藻中提取的蛋白多糖具有抑制白血病癌细胞的功能，但此文件没有透露藻蛋白多糖的其它治疗效果和功能。

20 在此文献中，也公开了藻蛋白多糖的提取方法，由于没有细胞进行破壁，所以其仅为实验室方法，不能进行大规模的工业化生产。

 本发明的发明人经过对藻蛋白多糖的提取和药用价值进行了大量研究，发现藻蛋白多糖具有多方面的治疗作用，由此提出本发明。

本发明公开

25 本发明的目的之一是提供一种含藻蛋白多糖提取物的抗癌组合物，其中含治疗有效量的藻蛋白多糖提取物和/或药物学上可接受的载体。

30 本发明的另一目的是提供一种含藻蛋白多糖提取物的改善血相组合物，其中含有治疗有效量的藻蛋白多糖提取物和/或药物学上可接受的载体。

本发明的另一目的是提供一种含藻蛋白多糖提取物的抗辐射剂，其中含有有效量的藻蛋白多糖提取物和/或药物学上可接受的载体。

本发明的另一目的是提供含藻蛋白多糖提取物的修复 DNA 剂，其中含有治疗有效量的藻蛋白多糖提取物和/或药物学上可接受的载体。

5 本发明的另一目的是提供含藻蛋白多糖提取物的抗病毒剂，其中含有治疗有效量的藻蛋白多糖提取物和/或药物学上可接受的载体。

本发明的另一目的是提供含藻蛋白多糖提取物的增免剂，其中含有治疗有效量的藻蛋白多糖提取物和/或药物学上可接受的载体。

10 本发明的又一目的是提供含藻蛋白多糖提取物的树突状细胞激活剂，其中含有治疗有效量的含藻蛋白多糖提取物和/或药物学上可接受的载体。

本发明的再一目的是提供藻蛋白多糖提取物的制备方法，其中包括步骤：

- 15 a. 将蓝绿藻类干粉溶于 5-20 倍水中，进行细胞破壁处理，
- b. 于 60-100℃ 下加热，冷却后固液分离，
- c. 将液体的 pH 值调至 <7，再进行固液分离，
- d. 将液体调节至中性，浓缩，必要时干燥。

附图的简要说明

20 图 1 是以本发明改善血相剂对小鼠进行的血相试验结果示图。

图 2 是本发明藻蛋白多糖提取物抑制 TOPO I 介导的负超螺旋 pBR322 解旋作用图谱。

图 3 是本发明藻蛋白多糖提取物对 TOPO II 介导的 KDNA 去连环作用抑制影响的图谱。

25 图 4 为本发明藻蛋白多糖提取物诱导人 HL-60 白血病细胞凋亡的琼脂糖凝胶电泳图。

图 5 是本发明藻蛋白多糖提取物的浓度与调亡细胞百分数的关系图。

图 6 是不同药物试剂对小鼠骨髓细胞状况的影响示图。

30 图 7 是小鼠骨髓 DNA 含量的测定结果。

图 8 是药物对小鼠 γ -球蛋白含量的效应。

图 9 是 T-淋巴细胞检验结果示图。

本发明详述

5 本发明提供了一种含藻蛋白多糖的提取物的药物组合物。在此组合物中，含有治疗有效量的藻蛋白多糖提取物，鉴于藻类生物没有任何毒副作用，因此本发明的藻蛋白多糖提取物没有进一步提纯，如需要，则可对提取物进行进一步的深加工，以获得较高的纯度。

10 本发明中所述的治疗有效量可根据具体情况而定，本领域普通技术人员根据实际所需药量可以很容易掌握，如可根据患者体重、年龄和病症情况确定。由于提取物都是无毒成分，所以根据需要，可以直接以提取物给药，此时药物组合物中则不含药物学上可接受的载体。当组合物中含有药物学上可接受载体时，它们可按制药领域常规方法混合而制备所需药剂。通常，活性成分可占整个药物组合物重量的 0.1-15 99.9%。

所述药物上可接受的载体包括制药领域常规使用的那些，如溶剂，赋形剂，崩解剂等等，药物组合物可制成口服液，胶囊，冲剂，片剂，九剂，粉剂，颗粒剂，糖浆，栓剂等常规试剂形式。

20 在本发明中，提取藻蛋白多糖的原料藻粉优选选用螺旋藻粉。步骤 a 中的破壁处理包括本领域常规使用方法，如超声处理，快速搅拌改变渗透压膨胀或酶解。

为除去藻粉表面培养物及杂质，可首先用少量水冲洗表面。通常状况下，步骤 b 中的加热时间为 0.5 到 2 小时为宜，优选加热 1 小时。加热可在 60-100℃ 范围内进行，优选在 80°-95℃，最好在 90℃ 下进行。

25 用水量可使用藻粉量的 8-15 倍，优选是藻粉的 10 倍。

在步骤 c 中，首先将液体调节至酸性(pH<7)，但优选调节至 2.0-4.5，最好将 pH 调节至 3.8-4.2。可用 HCl 或硫酸以及 Na₂CO₃ 或 NaHCO₃ 等常规酸碱试剂调节 pH。

30 在本发明方法中，所述的固液分离为本领域常规使用的那些分离方法，如减压抽滤，分子筛滤网过滤，离心分离等。由于本发明方法

中，对细胞进行了破壁处理，因而可得到较高产率的藻蛋白多糖提取物。

用本发明方法提取的藻蛋白多糖具有抗肿瘤、抗辐射、增强机体免疫能力、修复 DNA 损伤、激活树突状细胞，提高和改善造血机能等作用。

以下结合以实施例对本发明作进一步说明。

藻蛋白多糖提取物的制备

实施例 1

将螺旋藻干粉 3kg 用 3 升水冲洗，抽滤，向滤渣中加入 30 升水快速搅拌，在 88℃ 下加热 1 小时，冷却后，减压过滤分离，滤液用盐酸调节 pH 值至 3.8，放置过夜，离心分离，上清液用 Na_2CO_3 溶液调节 pH 至 3.8，然后喷雾干燥，得到藻蛋白多糖提取物粗品 0.599kg，经测定提取物中蛋白多糖含量为 72.3%。

实施例 2

将螺旋藻干粉 3kg 加入到 24 升水中，搅拌，在 90℃ 下加热 1 小时，冷却后，减压过滤，滤液用盐酸调节至 pH 为 4.2，放置过夜，过滤分离，滤液用 NaHCO_3 溶液调节 pH 至 7。干燥得藻蛋白多糖粗品 0.549kg，经测定其中蛋白多糖含量为 71.2%。

生测试验

1. 抗辐射：

实验一、抗辐射实验

取购自中国医科大学动物中心的、体重 18-22 克的 C-57 小鼠 150 只，120 只以 ^{60}Co - γ 射线进行全身照射，辐照剂量 600 拉德，计量率为 8.64 拉德/分。

照射后的小鼠每 30 只一组，分为照射对照组、低剂量组、中剂量组、高剂量组；30 只未经照射的小鼠为空白对照组。空白组与照射对照组不喂药；低剂量组喂食藻蛋白多糖提取物 10mg/Kg/日；中剂量

组喂食藻蛋白多糖提取物 20mg/Kg/日；高剂量组喂食藻蛋白多糖提取物 40mg/Kg/日。十日后，统计各组存活率如下：（以每组存活动物数表示）

照射后天数 组别	0	3	6	10	10 天存活率 (%)
高剂量组	30	30	26	22	73
中剂量组	30	30	26	19	63
低剂量组	30	30	26	10	33
照射对照组	30	6	6	3	10
空白对照组	30	30	30	30	100

实验表明，喂食藻蛋白多糖提取物的小鼠，存活率明显高于照射对照组，证明藻蛋白多糖提取物有显著的抗辐射损伤的作用，尤以中、高剂量组效果明显。

2. 改善造血功能、改善血相，提高血小板数值，

实验一、血相检验：

取购自中国医科大学动物中心的、体重 18-22 克的 C-57 小鼠，以 ^{60}Co - γ 射线进行全身照射，辐照剂量 600 拉德，计量率为 8.64 拉德/分。

照射后的小鼠分为照射对照组、阳性对照组、低剂量组、中剂量组、高剂量组；未经照射的小鼠为空白对照组。空白组与照射对照组不喂药；阳性对照组喂食天津达仁堂制药厂生产的升血丸（放疗科常用的恢复血相药物），6000 mg/Kg/日（为成人服用量的 20 倍）；低剂量组喂食藻蛋白多糖提取物 10mg/Kg/日；中剂量组喂食藻蛋白多糖提取物 20mg/Kg/日；高剂量组喂食藻蛋白多糖提取物 40mg/Kg/日。各组分别于照射后第 1, 3, 6 天取小鼠尾血，按常规血相化验方法检测。

实验结果如下：（表内为白细胞总数 $\times 50^*$ ）

	第一天(n=10)	第三天(n=10)	第六天(n=7)
高剂量组	120 \pm 10.62(<0.01)	89.3 \pm 3.59(<0.01)	163.7 \pm 22.1(<0.01)
中剂量组	70.67.74(<0.3)	78.2 \pm 13.3(<0.05)	109.3 \pm 8.03(<0.02)
低剂量组	86.1 \pm 9.79(<0.05)	56.7 \pm 4.34(<0.3)	89.0 \pm 9.76(>0.5)
照射对照组	57.2 \pm 6.02	47.0 \pm 3.82	85.6 \pm 4.5
空白对照组	354.4 \pm 25.2	277.1 \pm 28.12	313.3 \pm 24054

细胞的测量数 \pm SE，总数 = 测量数 $\times 50$ ，括号内为与照射对照组相比的 P 值，n 为每个实验组的动物数

实验证明：给药组的白细胞数均比照射对照组高，且高剂量组的效果更明显（ $P < 0.01$ ），低剂量组的效果也超过阳性对照组，图示结果见图 1。

实验二、海军某部进行一项强辐射环境下的工程，参与人员遭受不同程度的辐射损伤，经服用提供的藻蛋白多糖提取物，白血球数量回升，免疫力显著增强。使用单位证明，该产品具有较强的升白作用。

实验三、海军某部卫生队，对 30 例白血球、血小板数量偏低的人员进行实验，使用藻蛋白多糖提取物口服给药，每日两次，每次三片。一个月后，73% 的人员白血球、血小板明显上升，饮食、睡眠、精神等方面均有明显改善，其余 26% 的人员因本身白血球数量不偏低，故效果不显著，但仍保持在正常范围内。使用单位证明，该产品具有较强的升白作用。

实验四、血小板计数实验

参照卫生部颁发的《新药临床前研究指导汇编》的要求，观察藻蛋白多糖提取物对 6.5Gy⁶⁰Co- γ 射线不均匀照射比格狗的治疗作用。阳性观察药为中外合资郑州东方药业有限公司生产的升白口服液。实验结果表明：各观察组动物的外周血白细胞、粒细胞、红细胞、及血红蛋白和血细胞比容均无明显的差异。以藻蛋白多糖提取物制成的胶囊 360mg 于照射前 3 天开始口服，连续 24 天。治疗组动物外周血小板数于照射后第 2 和第 4 周明显高于对照组（ $P < 0.01$ ）。对骨髓巨核细胞的恢复有一定的促进作用，骨髓切片中巨核细胞数也有所增加。

治疗组动物外周血淋巴细胞转化率明显高于照射对照组和升白口服液治疗组。

以上结果表明：藻蛋白多糖提取物可以明显恢复照射后比格狗的外周血小板数和淋巴细胞转化率，促进骨髓巨核系造血祖细胞的增殖，可望作为大剂量放化疗的肿瘤病人及急性放射病病人血小板减少及免疫功能低下时的治疗药物。

3. 抑制多种肿瘤的增殖生长

藻蛋白多糖提取物在体外对人白血病细胞 U937、HL-60、P388 有明显的抑制其增殖的作用；对人肺癌 A49、人肝癌 HEP-G2 以及人胃肠道肿瘤 MKN-28、HCT116 细胞也有明显的抑制其增殖生长的作用。其在体内对小鼠 S180 肉瘤、B16 黑色素瘤，以及人胃癌 MKN-28、SGC-7901 和人肺腺癌 LAX83 裸小鼠移植瘤也有明显的生长抑制作用。

实验一、体外抑制多种肿瘤

实验所用肿瘤细胞株：

P-388	小鼠淋巴白血病
U-937	人大单核细胞白血病
HL-60	人淋巴母细胞性白血病
K-562	人红白血病
A-549	人非小细胞性肺癌
SPC-A4	人肺腺癌
DMS-114	人小细胞性肺癌
NCI-H23	人肺腺癌
SGC-7901	人胃中分化性腺癌
MKN-28	人胃高分化性腺癌
HCT-116	人结肠低分化性腺癌
Hep-G2	人肝细胞性肝癌
MCF-7	人乳房腺癌
A-431	人皮肤鳞癌。

以上细胞株均为本实验室保种及传代。

测定方法：P-388、U-937、HL-60 和 K-562 为悬浮肿瘤细胞株采用四氮唑盐还原法（MTT），按不同肿瘤生长速率，将一定数量处于对数生长期的肿瘤细胞 90μl/孔接种于 96 孔微量培养板内，然后加入藻蛋白多糖提取物液 10μl/孔，根据预实验结果，对每个细胞株，藻蛋白多糖提取物分别设五个浓度，每个浓度均为三个复孔。另设无细胞
5 调零孔、相应药物浓度无细胞调零孔作为对照。肿瘤细胞在 37℃、5%CO₂ 条件下培养 48 小时后，加 MTT(Sigma)液 20μl/孔；继续培养 4 小时后，加入三联液（10%SDS-5%异丁醇-0.01mol/lHCl）50μl/孔，于 CO₂ 培养箱中过夜。然后用酶标仪测 OD₅₇₀ 值。按下列公式计算
10 被测物对癌细胞生长的抑制率，半数抑制量 IC₅₀ 值采用 Logit 法计算。

其余细胞株为贴壁肿瘤细胞，采用磺酰罗丹明 B 旦白质染色法（SRB），先贴壁 24 小时，培养方法同 MTT 法。肿瘤细胞贴壁 24 小时后，加入不同浓度的藻蛋白多糖提取物，作用时间为 72 小时。然后去培养液，用 10%冷 TCA 固定细胞，4℃放置 1 小时后，用蒸馏
15 水反复洗涤，空气中自然干燥。干燥后加入由冰醋酸配制的 SRB（Sigma）溶液 100μl/孔，室温中染色 15 分钟，去上清液，用 1%醋酸反复洗涤，空气中自干。最后加入 150μl/孔 Tris 溶液，用酶标仪测各孔的 OD₅₇₀ 值。抑制率和 IC₅₀ 的计算方法同 MTT 法。

$$\text{肿瘤抑制率} = \frac{\text{对照组OD值} - \text{治疗组 OD值}}{\text{对照组OD值}} \times 100\%$$

表 1.藻蛋白多糖提取物体外肿瘤对细胞增殖生长的抑制率(%)和 IC50 值

浓度(mg/ml)	5	1.67	0.56	0.185	0.062	IC50(mg/ml)
细胞株						
P-388	90.7	72.1	31.4	5.8	1.2	1.03
H1-60	95.7	63.8	25.5	17.0	0.0	1.22
U-937	87.5	66.1	35.7	37.5	3.6	0.93
MKN-28	76.2	55.4	24.8	20.8	14.9	1.29
SGC-7901	48.3	6.2	2.1	3.4	0.0	----
A-431	0.0	0.0	0.0	1.8	4.6	----
SPC-A4	41.2	23.5	26.5	9.8	0.0	---
	5	3.3	2.2	1.48	0.99	
A-549	92.4	86.4	50.0	30.3	54.5	2.0
NCI-H23	30.9	10.3	0.0	4.4	0.0	---
DMS-114	75.0	63.5	46.2	36.5	19.2	2.36
Hep-G2	85.9	87.5	75.0	39.8	23.4	1.61
K562	85.1	73.1	41.8	29.9	19.4	2.18
MCF-7	0.0	6.3	20.8	1.7	0.0	----
HCT-116	86.1	65.7	44.4	30.6	24.1	2.15

实验二、藻蛋白多糖提取物对 DNA 拓扑异构酶活性抑制及对 DNA 的直接影响

5 真核生物的 DNA 的拓扑结构由两类关键酶即 I 类(topoisomerase I, TOPO I)和 II 类(topoisomerase II, TOPO II)拓扑异构酶调节。TOPO I 引起 DNA 单链断裂,虽然不是真核细胞生存所必需,但也在染色体组织、DNA 复制、转录过程中起重要作用。TOPO II 是细胞所必需的,能够催化 DNA 的双链断裂,在 DNA 复制、转录、重组中,以及

10 在形成正确的染色体结构、染色体分离、浓缩中发挥重要作用。由于 TOPO I 和 TOPO II 的细胞功能以及其催化特性,成为临床上相当广泛的化学治疗药品的靶。

具有 DNA 嵌合能力的 DNA 拓扑异构酶抑制剂可与 DNA 直接结合,但并不能引起 DNA 断裂;而另一类化合物可充当 DNA 分子剪,直接切断 DNA。无论是拓扑异构酶抑制剂还是 DNA 分子剪,它们最终作用对象都是 DNA,使 DNA 代谢发生紊乱而导致细胞死亡。

5

实验方法:

1、藻蛋白多糖提取物对 TOPO I 活性的影响:

藻蛋白多糖提取物可抑制 TOPO I 介导的负超螺旋 pBR322 解旋作用

10

2、藻蛋白多糖提取物对 TOPO II 活性的影响:

藻蛋白多糖提取物可抑制 TOPOII 介导的 kDNA 去连环作用

实验结果见图 2 和图 3

15

1. 藻蛋白多糖提取物可抑制 TOPO I 介导的负超螺旋 pBR322 解旋作用。

20

在图 2 中,泳道 1: pBR322 对照;泳道 2: 1u TOPOI 酶粗提液;泳道 3: 50 μ M 羟基喜树碱;泳道 4-10: 0.64, 3.2, 16, 80, 400, 2000, 10000 μ g/ml 藻蛋白多糖提取物的 DMSO 可溶性成分;泳道 11-17: 0.64, 3.2, 16, 80, 400, 2000, 10000 μ g/ml 藻蛋白多糖提取物的水溶性成分。

2. 藻蛋白多糖提取物对 TOPOII 介导的 kDNA 去连环作用的影响

25

在图 3 中,泳道 1: kDNA 对照;泳道 2 和 10: 1u TOPOII 酶粗提液;泳道 3: 50 μ M VP16;泳道 4-9, 11: 0.64, 3.2, 16, 80, 400, 2000, 10000 μ g/ml 藻蛋白多糖提取物的 DMSO 可溶性成分;泳道 12-17: 0.64, 3.2, 16, 80, 400, 2000 μ g/ml 藻蛋白多糖提取物的水溶性成分;泳道 18: 20% DMSO。

30

实验结果表明,无论在 TOPO I 介导的超螺旋 pBR322 解旋的反应中,还是在 TOPO II 介导的 kDNA 去连环的反应中,藻蛋白多糖提取物的两种成分均能抑制 TOPO I 和 TOPO II 的活性,但是二者抑制

能力有较大差别。水溶性成分对 TOPO I 和 TOPO II 的抑制能力较强，3.2 $\mu\text{g/ml}$ 和 16 $\mu\text{g/ml}$ 的剂量即分别完全抑制了 TOPO I 和 TOPO II 的活性，而 DMSO 可溶性成分达到完全抑制效应的剂量分别为 80 $\mu\text{g/ml}$ (TOPO I)和 2000 $\mu\text{g/ml}$ (TOPO II)。

5 这些现象表明，水溶性成分是藻蛋白多糖提取物抑制 TOPO 酶的主要活性成分，其作用机理可能是首先与 DNA 相互作用，导致 DNA 构象的改变，使酶不能与底物有效接触，酶活力下降乃至为零。藻蛋白多糖提取物的 DMSO 可溶性成分对 TOPO I 和 TOPO II 也有不同程度的抑制，有可能该成分作用靶点为酶，直接与酶作用而导致酶的
10 催化活力下降。

综上所述，藻蛋白多糖提取物的水溶性和 DMSO 可溶性成分对 TOPO I 和 TOPO II 都有较为明显的抑制作用，水溶性成分还可直接引起 DNA 双链断裂。

实验三、藻蛋白多糖提取物对蛋白酪氨酸激酶 (TPK) 的作用

15 蛋白酪氨酸激酶 (tyrosine protein kinases, TPK) 是信号传递过程中的关键因子，与细胞生长、增殖、转化密切相关。许多癌基因的表达产物都具有 TPK 活性，很多恶性转化细胞中的 TPK 活性远远高于正常细胞。所以若能降低 TPK 的活性就可能阻断肿瘤细胞的失控生长。

20 表皮细胞生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 是一种受体型 TPK，它是由 1186 个氨基酸组成的单链跨膜糖蛋白，分子量为 17000 道尔顿，广泛分布于哺乳动物的上皮细胞膜上。磷酸化后 EGFR 受体 C 末端可识别和激活胞内多种底物酶，通过一系列反应影响细胞的代谢、生长和癌变。研究表明 EGFR 在许多肿瘤中异常
25 表达，并与肿瘤的转移和预后有密切的关系。本实验选择富含 EGFR 的 A431 细胞提取 TPK，观察藻蛋白多糖提取物对 TPK 磷酸化活力的影响。

实验结果:

实验结果 1:

藻蛋白多糖 提取物浓度 (mg/ml)	5.0	2.5	1.2	0.6	0.3
抑制率 (%)	100	100	100	67.9	65.0

阳性对照: 2.5mM tyrphostin 25, 抑制率 100 %

实验结果 2:

藻蛋白多糖 提取物 浓度 (mg/ml)	1.5	0.75	0.4	0.2	0.1
抑制率 (%)	94.1	72.5	62.7	62.7	47.1

阳性对照: 0.25mM 的 tyrphostin 25, 抑制率 86.1 %

实验结果 3:

藻蛋白多糖 提取物 浓度 (mg/ml)	1.2	0.6	0.3	0.15	0.07
抑制率 (%)	89	80.6	67.7	54.1	37.7

阳性对照: 0.25mM 的 tyrphostin 25, 抑制率 80.5 %

实验结果表明藻蛋白多糖提取物能明显抑制 TPK 的活性, 浓度高于 1.2mg/ml 时几乎完全抑制了 TPK 的酪氨酸磷酸化, 在 0.3mg/ml 时对 TPK 的抑制在 65 - 67 % 左右; 继续降低藻蛋白多糖提取物的浓度到 0.07mg/ml 时对 TPK 活性仍有 37.7% 的抑制。

以上实验证明了藻蛋白多糖提取物能明显抑制 TPK 上酪氨酸残基的磷酸化。它可能正是通过对酶的抑制从而阻断由 TPK 介导的信号传导通路, 达到遏制肿瘤细胞的恶性生长, 从而发挥其抗肿瘤作用。

实验四、藻蛋白多糖提取物诱导人 HL - 60 白血病细胞的凋亡

凋亡是细胞在基因调控下的一种主动死亡, 其调节功能的紊乱与恶性肿瘤的发生密切相关。已知多种抗癌药物可引起肿瘤细胞的凋亡, 且抗癌疗效与其诱导肿瘤细胞凋亡的能力有关。诱导细胞凋亡可

能是不同机制抗癌药物发挥作用的共同通路, 所以细胞凋亡成为评估疗效的一项新指标, 诱导肿瘤细胞凋亡也成为一个新的抗肿瘤作用靶点。

5 实验方法与结果

琼脂糖凝胶电泳

当细胞发生凋亡时, 核酸内切酶激活, DNA 在核小体间断裂, 形成 180 - 200bp 整倍数的 DNA 片断, 琼脂糖凝胶电泳能检测到特征性的梯形条带, 试验结果见图 4。图 4 中, 1 为对照, 2 为藻蛋白多糖提取物 1mg/ml, 3 为藻蛋白多糖提取物 3mg/ml, 4 为藻蛋白多糖提取物 6mg/ml。

流式细胞术

细胞凋亡时, 断裂的 DNA 小片断逸出细胞, 使细胞内 DNA 含量下降, 流式细胞仪就能检测到在细胞增殖 G1 期之前, 有一群低于二倍体 DNA 含量的亚 G1 期细胞, 即凋亡状态细胞, 试验结果见图 5。

以上实验证明, 藻蛋白多糖提取物对体内多种白血病及实体肿瘤均具有明显的抑制作用。其一方面作为 EGFR 酪氨酸激酶抑制剂, 阻断该细胞增殖信号通路, 抑制肿瘤细胞的生长; 另一方面作为拓扑异构酶抑制剂, 影响 DNA 的复制、转录。最终影响基因的表达, 诱导肿瘤发生细胞凋亡。由于藻蛋白多糖提取物的毒副作用很小, 又是口服给药, 在临床上可长期服用; 实验研究中体内外抗肿瘤作用明显, 作用靶点清楚明确, 所以有望成为一个很有应用前途的抗癌新药。

4. 修复 DNA

实验一、骨髓损伤实验

25 取购自中国医科大学动物中心的、体重 18-22 克的、C-57 小鼠, 以 ^{60}Co - γ 射线进行全身照射, 辐照剂量 600 拉德, 计量率为 8.64 拉德/分。

组别	细胞数/50mm ² (平均数)	未成熟细胞占比例 (平均数)	细胞分裂相
空白对照组	140	40	有
照射对照组	31	4	无
低剂量组	72	30	有
高剂量组	74	35	有
阳性对照组	45	35	有

照射后的小鼠分为照射对照组、低剂量组、中剂量组、高剂量组；未经照射的小鼠为空白对照组。空白组与照射对照组不喂药；低剂量组喂食藻蛋白多糖提取物 10mg/Kg/日；中剂量组喂食藻蛋白多糖提取物 20mg/Kg/日；高剂量组喂食藻蛋白多糖提取物 40mg/Kg/日。在照射后的第二天，各组分别随机取 10 只小鼠进行解剖，取材做组织切片。用显微镜观察，在放大 750 倍下计数。

实验结果见图 6，表明：

照射对小鼠骨髓有明显的损伤以照射对照组最为显著，其骨髓呈空网状，单位面积细胞数量明显减少，细胞发育中断，年幼细胞仅占 4%左右，未见细胞分裂相。骨髓中毛细血管壁受损，引起出血，形成“血池”。而给药组则受损明显减轻。

实验二、骨髓 DNA 含量测定

照射及给药同上。在照射后的第六天，各组分别随机取 10 只小鼠进行解剖，取一侧完整股骨，除净软组织，用 0.005McaCl₂10ml 将全部骨髓冲入离心管中，置 4℃冰箱 30 分钟，2500 转/分离心 15 分钟，沉淀物加 0.2MHClO₄5ml 充分混合，90℃加热 15 分钟，冷却后离心，上清液在 286nm 处测定紫外吸收 OD 值。DNA 含量计算：O.D.值按 1.0=33 μg/mlDNA。

实验结果如下:

组 别	空白对照组	照射对照组	低剂量组	中剂量组	高剂量组	阳性对照组
DNA 含量 μg/ml	49.04	2.01	2.71	8.94	6.34	3.56
	27.03	2.94	8.42	10.00	4.82	2.38
	27.92	1.58	7.19	7.79	6.14	4.79
	27.19		4.42		3.70	6.34
平均值	32.79	2.18	5.68	8.91	5.25	4.27
P			<0.05	<0.01	<0.01	<0.01

图示结果见图 7, 表明: 各给药组的 DNA 测定值均高于照射对照组。经统计给药中剂量组、高剂量组及阳性对照组与照射对照组相比均有显著差异 ($P < 0.01$)。说明药物对骨髓细胞有较好的保护作用, 对 DNA 有明显的修复作用。

5. 抗病毒

临床病理:

患者 1. $\times \times \times$, 中年男性, 北京大兴县农民。早先患病毒性肝炎, 后发展为肝硬化, 10 余年, 并发严重腹水、消化道大出血, 经医生诊断, 存活希望不大。后服用藻蛋白多糖提取物, 每日两次, 每次一粒, 连续 60 天, 腹水明显减轻, 未再发生大出血, 至服药 90 天时, 腹水基本消失, 至服药 180 天时, 不仅生活自理, 而且恢复正常工作, 身体无不适感, 精力充沛。99 年在 301 医院做 CT 检查, 并与 10 年前 CT 比较, 病灶未继续扩大或恶化。病理学家认为, 肝硬化 10 年后, 未见恶化迹象, 实属罕见。

患者 2. $\times \times \times$, 北京某小学校长。因患病毒性肝炎, 治疗不力, 后发展为肝硬化, 并发严重腹水、消化道大出血, 生命垂危。后服用藻蛋白多糖提取物, 每日两次, 每次一粒, 连续 60 天, 腹水明显减轻, 未再发生大出血, 至服药 90 天时, 腹水基本消失, 至服药 180 天时, 不仅生活自理, 而且恢复正常工作, 身体无不适感, 精力充沛。99 年在 301 医院做 CT 检查, 未发现病灶。病理学家认为, 有理由认定病毒已被抑制。

6. 修复黏膜损伤:

取购自中国医科大学动物中心的、体重 18-22 克的 C-57 小鼠，以 ^{60}Co - γ 射线进行全身照射，辐照剂量 600 拉德，计量率为 8.64 拉德/分。

照射后的小鼠分为照射对照组、低剂量组、中剂量组、高剂量组；未经照射的小鼠为空白对照组。空白组与照射对照组不喂药；低剂量组喂食藻蛋白多糖提取物 10mg/Kg/日；中剂量组喂食藻蛋白多糖提取物 20mg/Kg/日；高剂量组喂食藻蛋白多糖提取物 40mg/Kg/日。在照射后的第七和第十四日，各组分别随机取 10 只小鼠进行解剖，取小肠做组织切片。用显微镜观察，计量并拍照。实验表明：

照射对小肠黏膜上皮细胞有明显的损伤，小肠黏膜顶部的黏膜上皮细胞出现破损，在受损伤严重的部位并发细胞脱落，造成绒毛顶部黏膜上皮细胞覆盖，固有膜裸露。但给药组的小肠黏膜上皮损伤程度与对照组相比较有明显的降低（好转）。

7. 增强免疫力：

实验一、 γ -球蛋白百分含量

取购自中国医科大学动物中心的、体重 18-22 克的、C-57 小鼠，以 ^{60}Co - γ 射线进行全身照射，辐照剂量 600 拉德，计量率为 8.64 拉德/分。

照射后的小鼠分为照射对照组、照射给药组；未经照射的小鼠为空白对照组、空白给药组。自小鼠眼眶取血，离心，取血清用微量加样器点样，染色后做色谱分析，根据各色带的吸收峰值计算在血清球蛋白中 γ -球蛋白相对含量。

实验结果如下：

组别	平均 γ -球蛋白相对百分含量(\pm SD)
空白对照	10.07 \pm 3.57
空白对照	12.84 \pm 6.75
照射对照	6.19 \pm 4.96
照射给药	13.32 \pm 6.73

图示结果见图 8，表明：无论照射组还是非照射组，给药组的 γ -球蛋白含量都高于相应的对照组，且照射给药组基本上平行于非照射

给药组。由于 γ -球蛋白可以代表机体的免疫功能，所以 γ -球蛋白相对含量的提高，可以说明机体免疫能力的提高。

实验二、T-淋巴细胞检验

取体重 18-22 克的小鼠，随机分为四组，每组 10 只。实验组每日每只腹腔注射环磷酰胺 10 mg/Kg，再经口灌胃“藻蛋白多糖提取物”药液，剂量如前；阳性对照组每日每只腹腔注射环磷酰胺 10 mg/Kg，再经口灌胃常水；空白对照组不注射环磷酰胺 10 mg/Kg，只经口灌胃常水；连续给药 10 天，停药 2 天，取眼眶血做白细胞推片、孵育、染色后，测定 T-淋巴细胞百分率。

实验结果如下：

组 别	T 淋巴细胞百分率	P 值
空白对照	28.0±2.55	
阳性对照	25.6±2.51	
高剂量	39.8±7.40	<0.01
低剂量	33.2±6.30	<0.05

图示结果见图 9，表明：

注射环磷酰胺后，造成小鼠 T-淋巴细胞明显下降，但给药组则呈明显升高，尤其是高剂量组，其 P 值小于 0.01，说明藻蛋白多糖提取物确有提高机体免疫功能和保护骨髓细胞的作用。

8. 藻蛋白多糖提取物对 CD43+造血干/祖细胞增殖分化的影响

材料和方法：

所有细胞均用含有相应细胞因子和 15%FCS 的 1640 培养基、于 37℃ 和 5%CO₂ 的条件下培养。

脐带血 CD34⁺造血干/祖细胞

脐血取自北京医科大学人民医院妇产科，肝素抗凝终浓度为 20U/ml，样品在采集 5 小时内分选 CD34⁺细胞。脐带血经 PBS 稀释后，用 0.1% 的甲基纤维素沉降红细胞，收集上清并利用淋巴细胞分离液分离单个核细胞（MNC），洗涤后利用吸附单克隆抗体—磁珠分选系统（MACS）进行分离，所用抗 CD34 抗体为 QBEND-10，磁珠为羊抗鼠 IgG1 免疫磁珠（德国 Miltenyi Biotec 公司）。将标记细胞通过置于磁场中的分离柱，洗脱去除未标记细胞，将分离柱移出磁场，加压洗

脱, 收集 CD34⁺细胞, 计数备用。

细胞因子

CD34⁺细胞液体培养中所用细胞因子及生产厂家见下表

造血细胞培养中所用的细胞因子及其来源

因子名称	来源
FL	Immunex
Tpo	Glaxo
SCF	Sandos
IL-6	Sandos
IL-3	Sandos
G-CSF	Amgen
GM-CSF	Amgen

5 抗体

进行流式细胞仪检测所用的单克隆抗体有 CD34-FITC、HLA-DR-FITC、CD33-PE、CD1a-PE、CD42b-PE, 均为 Pharmingen 产品。

对 CD34⁺造血干/祖细胞增殖和分化影响的检测

10 CD34⁺造血干/祖细胞液体培养体系为 IMDM + 15%FCS + 15%HS + 40ng/ml FL + 20ng/ml Tpo + 200ng/ml SCF + 10ng/ml IL-6 + 10ng/ml IL-3 + 2 × 10⁴u/ml G-CSF。将 CD34⁺细胞以 3 × 10⁴ 细胞/ml 接种于 24 孔细胞培养板中, 每孔 1ml。藻蛋白多糖提取物剂量分别为 0、0.2、0.4 和 0.8mg/ml, 每个剂量重复三孔。37°C、5%CO₂ 和饱和湿度下培养, 每 48 小时加细胞因子一次。培养 10 天后, 收集细胞并利用相应的荧光素标记抗体进行细胞表型分析。

15 实验结果:

20 在 FL、TPO、SCF、IL-6、IL-3 和 G-CSF 存在下, CD34⁺细胞的增殖情况同藻蛋白多糖提取物的浓度呈负相关, 即在无藻蛋白多糖提取物存在的情况下, 细胞增殖分化活跃, 细胞数增加明显, 但分化速率也明显加快, 培养 10 天后, 绝大部分 CD34⁺细胞已分化为成熟细胞。而随着藻蛋白多糖提取物浓度的增加, 细胞增殖程度降低, 而且显微镜下观察细胞变形、贴壁明显增多, 提示藻蛋白多糖提取物可能

具有部分拮抗细胞因子促进 CD34⁺细胞增殖的作用, 并且明显地降低了 CD34⁺细胞的分化速率, 培养结束时 CD34⁺细胞及粒系和巨核系祖细胞的比例均明显高于单纯细胞因子组。

在不同浓度藻蛋白多糖提取物存在下脐血 CD34⁺细胞培养 10 天后行流式细胞仪检测, 检测结果见下表

不同浓度藻蛋白多糖提取物作用下不同表型细胞的比例

藻蛋白多糖提取物浓度 (mg/ml)	细胞百分比 (%)				
	CD34 ⁺	CD34 ⁺ CD33 ⁺	CD34 ⁺ CD42b ⁺	CD1a ⁺	HLA-DR ⁺
0	0.07	0.08	0	1.7	26.87
0.2	1.10	0.71	0.16	13.09	73.94
0.4	4.83	2.08	1.77	23.12	86.49
0.8	25.75	7.78	9.03	19.02	80.98

由上表中可以看出, 随着藻蛋白多糖提取物浓度的增加, CD34⁺细胞比例明显增高, 代表粒/单系祖细胞的 CD34⁺CD33⁺细胞以及代表巨核系祖细胞的 CD34⁺CD42b⁺细胞的比例也明显增高; 另一结果是反映树突状细胞 (Dendritic Cell, DC) 的 CD1a⁺和 HLA-DR⁺细胞的比例也随着藻蛋白多糖提取物浓度的增加而明显增高, 且培养瓶中出现大量典型的树状突样细胞, 表明藻蛋白多糖提取物具有诱导 CD34⁺细胞向 DC 分化的作用, 且在 0.4mg/ml 时诱导效率最高。

藻蛋白多糖提取物刺激淋巴细胞分泌细胞因子的作用

不同剂量藻蛋白多糖提取物刺激淋巴细胞分泌 IL-2、IL-3、GM-CSF 和 IFN- γ 的量分别示于下表, 可见藻蛋白多糖提取物对淋巴细胞分泌 GM-CSF 具有明显的刺激作用, 且呈现典型的剂量相关性, 随着藻蛋白多糖提取物剂量的增高, GM-CSF 的分泌量明显增大, 当藻蛋白多糖提取物达到 0.8mg/ml 时, GM-CSF 的分泌量增加达 11.5 倍。但藻蛋白多糖提取物对淋巴细胞分泌 IL-2、IL-3 和 IFN- γ 刺激作用则不明显。

藻蛋白多糖提取物刺激人外周血淋巴细胞分泌细胞因子

藻蛋白多糖提取物 (mg/ml)	0	0.2	0.4	0.8
GM-CSF (pg/ml)	20.4	67.3	196.2	235.3
IL-2 (pg/ml)	0	1.2	0	0
IL-3 (pg/ml)	3.2	3.2	2.9	3.0
IFN- γ (pg/ml)	13.8	12.5	12.8	13.0

结论:

1. 藻蛋白多糖提取物对脐带血 CD34⁺造血干/祖细胞在细胞因子存在下的增殖具有负调控作用, 并且明显地降低了 CD34⁺细胞的分化速率。在 CD34⁺细胞培养体系中, 随着藻蛋白多糖提取物浓度的增加, CD34⁺造血干/祖细胞、CD34⁺CD33⁺粒系祖细胞、CD34⁺CD42b⁺巨核系祖细胞的比例均明显高于单纯细胞因子组, 提示藻蛋白多糖提取物可能具有部分拮抗细胞因子促进 CD34⁺细胞增殖的作用, 从而使造血干/祖细胞的分化速率减低, 保留较高比例的粒系及巨核系祖细胞, 维持较长时间的造血。以此结果推测, 藻蛋白多糖提取物在动物整体试验中促进粒细胞和血小板恢复的作用将比细胞因子的作用延迟出现, 但其维持粒细胞和血小板的作用将更加明显。

2. 树突状细胞 (Dendritic Cell, DC) 是体内最有效的专职抗原递呈细胞 (APC), 在宿主的免疫反应中起着重要的作用, 它可以识别突变的细胞, 并将其信号传递给效应细胞, 最终达到杀灭和清除肿瘤细胞的目的。DC 在体内数量很少, 因而影响了其功能的发挥。因此, 如何使 DC 的数量明显扩增, 就成为了目前肿瘤免疫治疗及其临床应用的关键和研究热点之一。虽然在本发明的培养体系中并未加入目前得到公认的 DC 诱导因子 GM-CSF、IL-4 或 TNF- α , 但 CD1a⁺和 HLA-DR⁺细胞 (DC 的重要表面标志) 的比例却随着藻蛋白多糖提取物的浓度的增加而明显增高, 表明藻蛋白多糖提取物具有明显的诱导 CD34⁺造血干/祖细胞向 DC 分化的作用, 且在 0.4mg/ml 时诱导效率最高 (CD1a⁺和 HLA-DR⁺细胞的比例分别由对照组的 1.70% 和 26.87% 增加至 23.12% 和 86.49%)。这提示藻蛋白多糖提取物在肿瘤的免疫治疗中具有十分重要的潜在价值和广阔的应用前景。

3. 藻蛋白多糖提取物对淋巴细胞分泌 GM-CSF 具有明显的刺激作用，且呈现典型的剂量相关性，随着藻蛋白多糖提取物剂量的增高，GM-CSF 分泌量明显增大（当藻蛋白多糖提取物达到 0.8mg/ml 时，GM-CSF 的分泌量增加达 11.5 倍）。提示藻蛋白多糖提取物对造血功能的恢复具有明显的改善作用，且其促进造血细胞增殖的作用谱较广；此外，GM-CSF 是树突状细胞（DC）增殖、成熟及发挥功能最主要的细胞因子之一，这也是藻蛋白多糖提取物诱导 DC 形成的可能机制之一。

5

权 利 要 求

1. 含藻蛋白多糖提取物的抗癌药物组合物, 其中含有有效量的藻蛋白多糖提取物和/或药物学上可接受的载体, 其中所述藻蛋白多糖提取物依下列步骤获得:

- a. 将蓝绿藻类干粉溶于 5-20 倍水中, 进行细胞破壁处理,
- b. 于 60-100℃下加热, 冷却后固液分离,
- c. 将液体的 pH 值调至<7, 再进行固液分离,
- d. 将液体调节至中性, 浓缩, 必要时干燥。

2. 根据权利要求 1 的组合物, 其中蓝绿藻选自螺旋藻。

3. 根据权利要求 1 的组合物, 其中步骤 a 中的水的用量为干藻粉的 8-15 倍。

4. 根据权利要求 3 的组合物, 其中步骤 a 中的水的用量为干藻粉的 10 倍。

5. 根据权利要求 1 的组合物, 其中步骤 b 中的加热温度为 80℃-95℃。

6. 根据权利要求 5 的组合物, 其中步骤 b 中的加热温度为 90℃。

7. 根据权利要求 1 的组合物, 其中步骤 c 中液体的 pH 值调节至 3.8-4.2。

8. 含藻蛋白多糖提取物的改善血相组合物, 其中含有有效量的藻蛋白多糖提取物和/或药物学上可接受的载体, 其中所述藻蛋白多糖提取物依下列步骤获得:

- a. 将蓝绿藻类干粉溶于 5-20 倍水中, 进行细胞破壁处理,
- b. 于 60-100℃下加热, 冷却后固液分离,
- c. 将液体的 pH 值调至<7, 再进行固液分离,
- d. 将液体调节至中性, 浓缩, 必要时干燥。

9. 根据权利要求 8 的组合物, 其中蓝绿藻选自螺旋藻。

10. 根据权利要求 8 的组合物, 其中步骤 a 中的水的用量为干藻粉的 8-15 倍。

11. 根据权利要求 10 的组合物, 其中步骤 a 中的水的用量为干藻粉的 10 倍。

12. 根据权利要求 8 的组合物, 其中步骤 b 中的加热温度为 80℃-95℃。

5 13. 根据权利要求 12 的组合物, 其中步骤 b 中的加热温度为 90℃。

14. 根据权利要求 8 的组合物, 其中步骤 c 中液体的 pH 值调节至 3.8-4.2。

10 15. 含藻蛋白多糖提取物的抗辐射剂, 其中含有有效量的藻蛋白多糖提取物和/或药物学上可接受的载体, 其中所述藻蛋白多糖提取物依下列步骤获得:

a. 将蓝绿藻类干粉溶于 5-20 倍水中, 进行细胞破壁处理,

b. 于 60-100℃下加热, 冷却后固液分离,

c. 将液体的 pH 值调至<7, 再进行固液分离,

d. 将液体调节至中性, 浓缩, 必要时干燥。

15 16. 根据权利要求 15 的组合物, 其中蓝绿藻选自螺旋藻。

17. 根据权利要求 15 的组合物, 其中步骤 a 中的水的用量为干藻粉的 8-15 倍。

18. 根据权利要求 17 的组合物, 其中步骤 a 中的水的用量为干藻粉的 10 倍。

20 19. 根据权利要求 15 的组合物, 其中步骤 b 中的加热温度为 80℃-95℃。

20. 根据权利要求 19 的组合物, 其中步骤 b 中的加热温度为 90℃。

21. 根据权利要求 15 的组合物, 其中步骤 c 中液体的 pH 值调节至 3.8-4.2。

25 22. 含藻蛋白多糖提取物的修复 DNA 剂, 其中含有治疗有效量的藻蛋白多糖提取物和/或药物学上可接受的载体, 其中所述藻蛋白多糖提取物依下列步骤获得:

a. 将蓝绿藻类干粉溶于 5-20 倍水中, 进行细胞破壁处理,

b. 于 60-100℃下加热, 冷却后固液分离,

30 c. 将液体的 pH 值调至<7, 再进行固液分离,

d. 将液体调节至中性, 浓缩, 必要时干燥。

23. 根据权利要求 22 的组合物, 其中蓝绿藻选自螺旋藻。

24. 根据权利要求 22 的组合物, 其中步骤 a 中的水的用量为干藻粉的 8-15 倍。

5 25. 根据权利要求 24 的组合物, 其中步骤 a 中的水的用量为干藻粉的 10 倍。

26. 根据权利要求 22 的组合物, 其中步骤 b 中的加热温度为 80℃-95℃。

27. 根据权利要求 26 的组合物, 其中步骤 b 中的加热温度为 90℃。

10 28. 根据权利要求 22 的组合物, 其中步骤 c 中液体的 pH 值调节至 3.8-4.2。

29. 含藻蛋白多糖提取物的抗病毒剂, 其中含有治疗有效量的藻蛋白多糖提取物和/或的学上可接受的载体, 其中所述藻蛋白多糖提取物依下列步骤获得:

15 a. 将蓝绿藻类干粉溶于 5-20 倍水中, 进行细胞破壁处理,

b. 于 60-100℃下加热, 冷却后固液分离,

c. 将液体的 pH 值调至<7, 再进行固液分离,

d. 将液体调节至中性, 浓缩, 必要时干燥。

30. 根据权利要求 29 的组合物, 其中蓝绿藻选自螺旋藻。

20 31. 根据权利要求 29 的组合物, 其中步骤 a 中的水的用量为干藻粉的 8-15 倍。

32. 根据权利要求 31 的组合物, 其中步骤 a 中的水的用量为干藻粉的 10 倍。

25 33. 根据权利要求 29 的组合物, 其中步骤 b 中的加热温度为 80℃-95℃。

34. 根据权利要求 33 的组合物, 其中步骤 b 中的加热温度为 90℃。

35. 根据权利要求 29 的组合物, 其中步骤 c 中液体的 pH 值调节至 3.8-4.2。

30 36. 含藻蛋白多糖提取物的增免剂, 其中含有治疗有效量的藻蛋白多糖提取物和/或药物学上可接受的载体, 其中所述藻蛋白多糖提取

物依下列步骤获得:

- a. 将蓝绿藻类干粉溶于 5-20 倍水中, 进行细胞破壁处理,
- b. 于 60-100℃下加热, 冷却后固液分离,
- c. 将液体的 pH 值调至<7, 再进行固液分离,
- d. 将液体调节至中性, 浓缩, 必要时干燥.

37. 根据权利要求 36 的组合物, 其中蓝绿藻选自螺旋藻。

38. 根据权利要求 36 的组合物, 其中步骤 a 中的水的用量为干藻粉的 8-15 倍。

39. 根据权利要求 38 的组合物, 其中步骤 a 中的水的用量为干藻粉的 10 倍。

40. 根据权利要求 36 的组合物, 其中步骤 b 中的加热温度为 80℃-95℃。

41. 根据权利要求 40 的组合物, 其中步骤 b 中的加热温度为 90℃。

42. 根据权利要求 36 的组合物, 其中步骤 c 中液体的 pH 值调节至 3.8-4.2。

43. 含藻蛋白多糖提取物的树突状细胞激活剂组合物, 其中含有治疗有效量的藻蛋白多糖提取物和/或药物学上可接受的载体, 其中所述藻蛋白多糖提取物依下列步骤获得:

- a. 将蓝绿藻类干粉溶于 5-20 倍水中, 进行细胞破壁处理,
- b. 于 60-100℃下加热, 冷却后固液分离,
- c. 将液体的 pH 值调至<7, 再进行固液分离,
- d. 将液体调节至中性, 浓缩, 必要时干燥.

44. 根据权利要求 43 的组合物, 其中蓝绿藻选自螺旋藻。

45. 根据权利要求 43 的组合物, 其中步骤 a 中的水的用量为干藻粉的 8-15 倍。

46. 根据权利要求 45 的组合物, 其中步骤 a 中的水的用量为干藻粉的 10 倍。

47. 根据权利要求 43 的组合物, 其中步骤 b 中的加热温度为 80℃-95℃。

48. 根据权利要求 47 的组合物, 其中步骤 b 中的加热温度为 90℃。

49. 根据权利要求 43 的组合物, 其中步骤 c 中液体的 pH 值调节至 3.8-4.2。

50. 藻蛋白多糖提取物的制备方法, 其中包括步骤:

- a. 将蓝绿藻类干粉溶于 5-20 倍水中, 进行细胞破壁处理,
- b. 于 60-100℃下加热, 冷却后固液分离,
- c. 将液体的 pH 值调至<7, 再进行固液分离,
- d. 将液体调节至中性, 浓缩, 必要时干燥。

51. 根据权利要求 50 的组合物, 其中蓝绿藻选自螺旋藻。

52. 根据权利要求 50 的组合物, 其中步骤 a 中的水的用量为干藻粉的 8-15 倍。

53. 根据权利要求 52 的组合物, 其中步骤 a 中的水的用量为干藻粉的 10 倍。

54. 根据权利要求 50 的组合物, 其中步骤 b 中的加热温度为 80℃-95℃。

55. 根据权利要求 54 的组合物, 其中步骤 b 中的加热温度为 90℃。

56. 根据权利要求 50 的组合物, 其中步骤 c 中液体的 pH 值调节至 3.8-4.2。

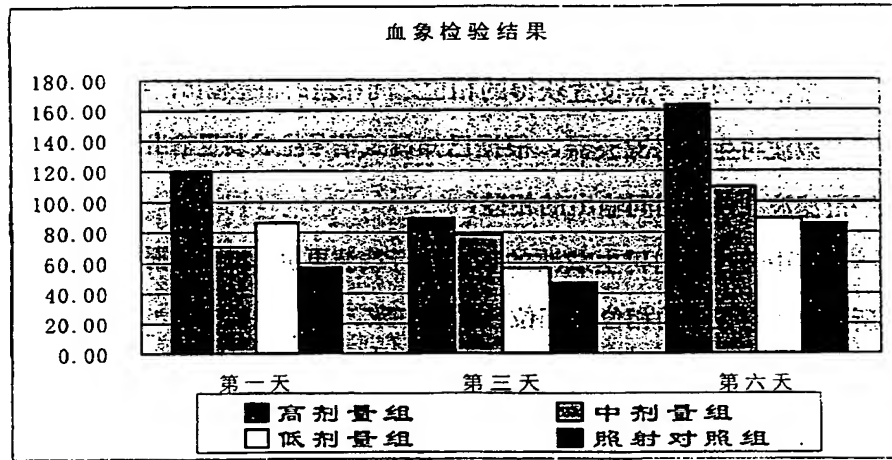


图 1

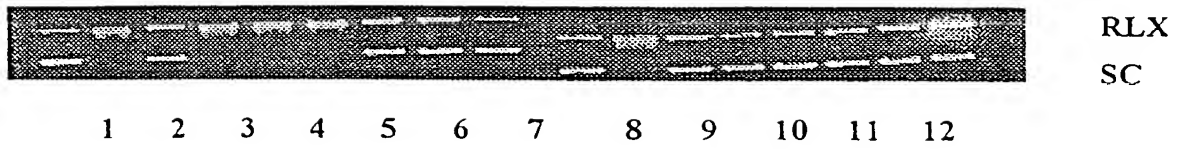


图 2

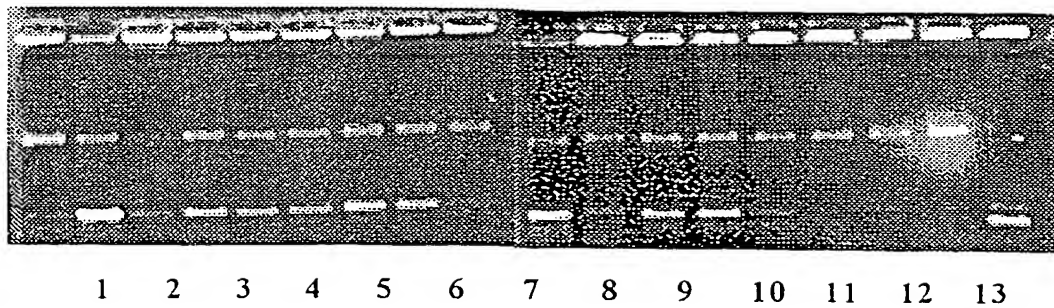


图 3





图 4

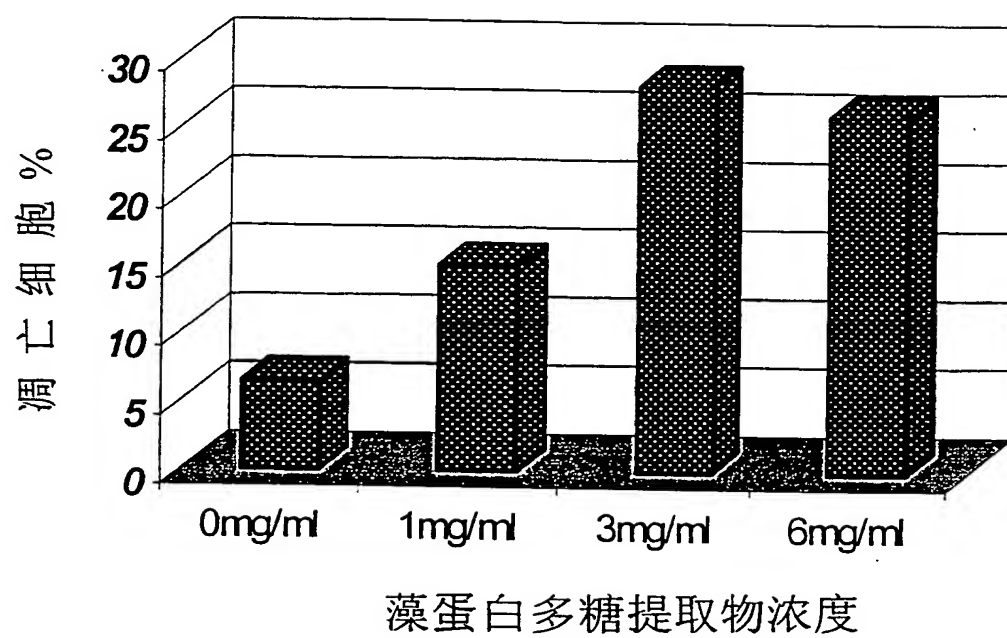


图 5



不同药物剂量对骨髓细胞状况的影响

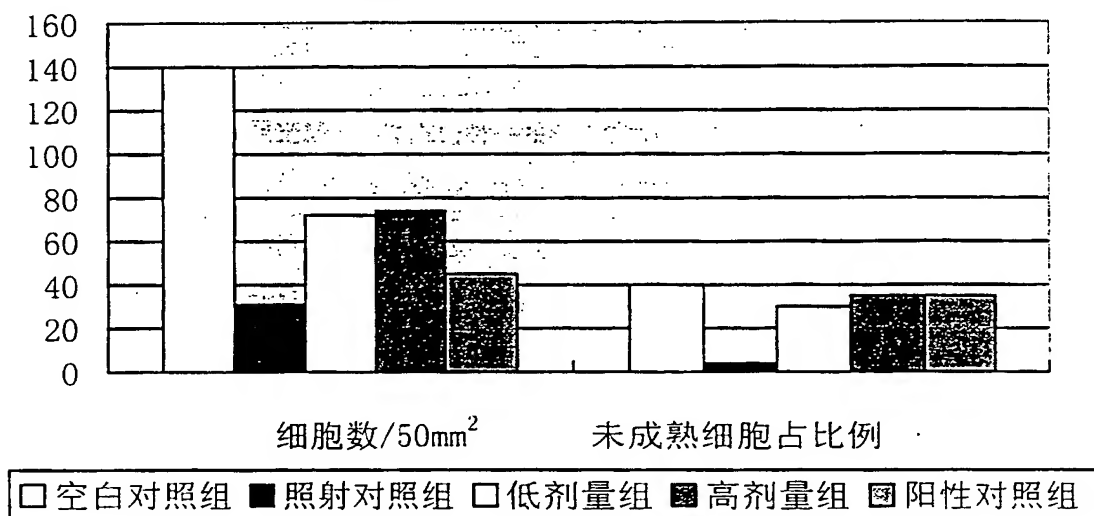


图 6

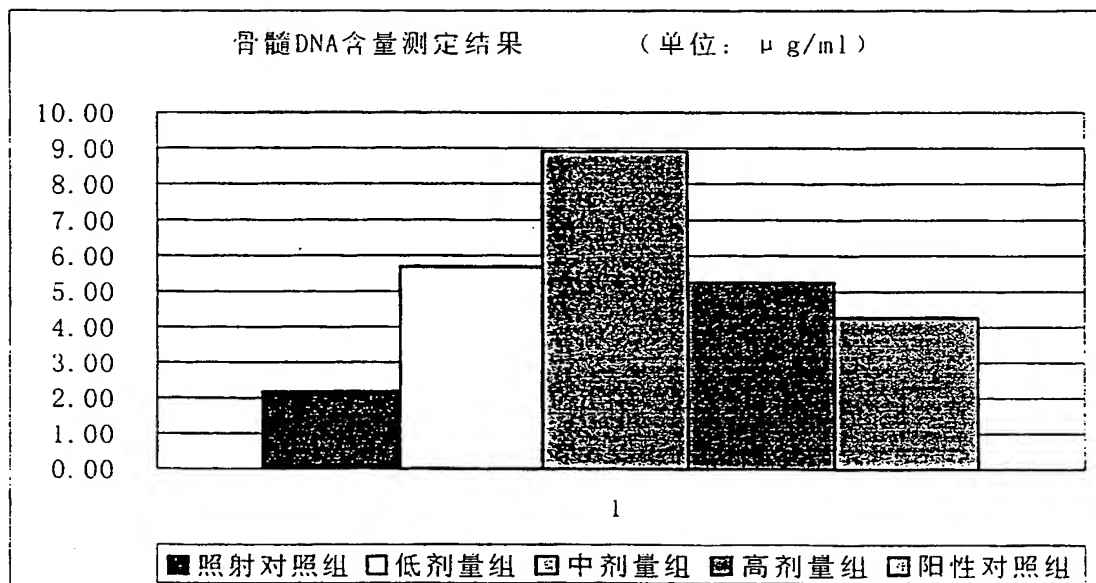


图 7



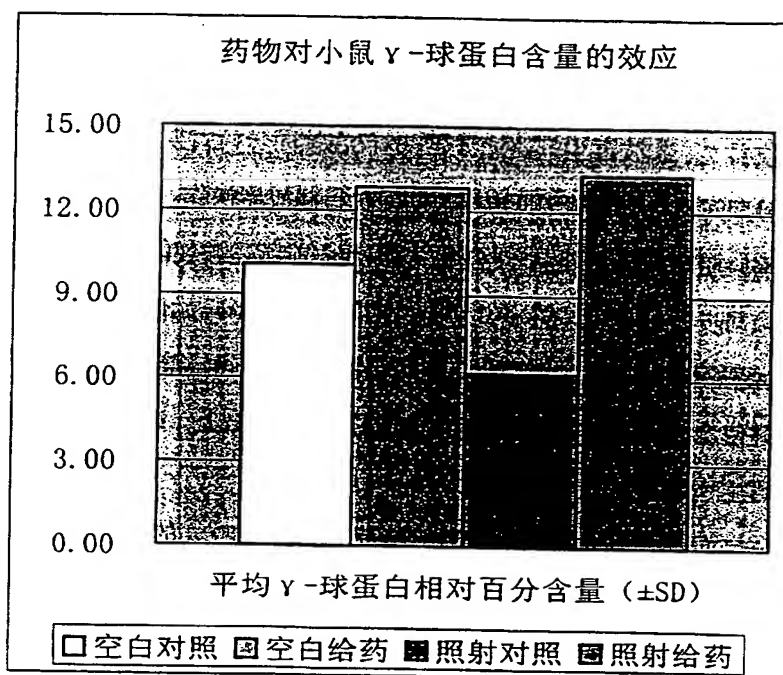


图 8

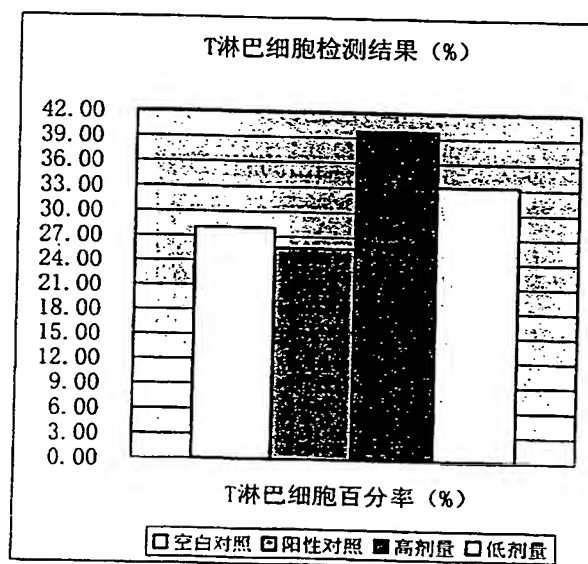
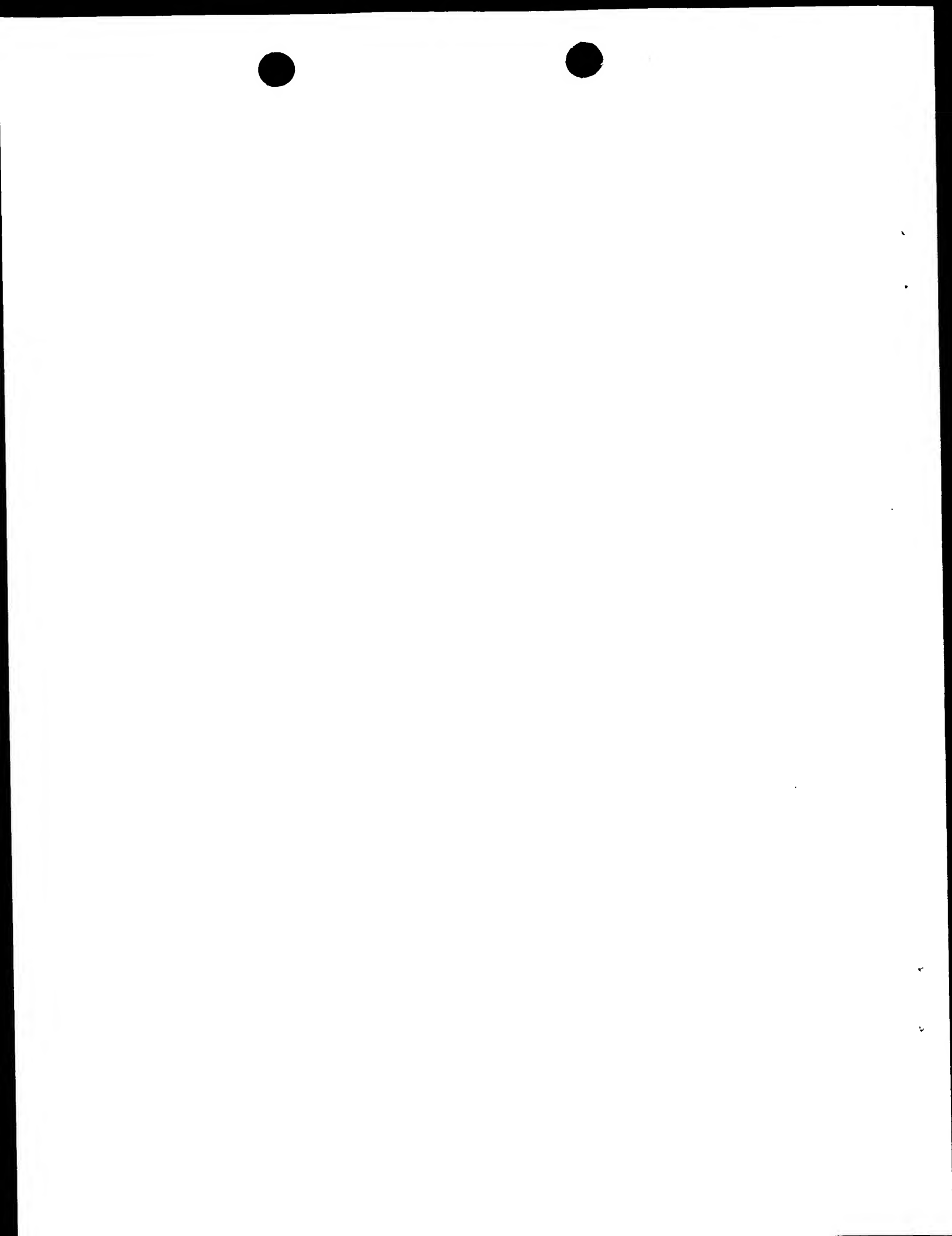


图 9



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN00/00205

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER:IPC (7) : A61K35/78, 31/715, A61P35/00, 7/00, 31/12, 37/02, 43/00
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC (7) : A61K35/78, 31/715, A61P35/00, 7/00, 31/12, 37/02, 43/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Chinese Patent Documentation

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI (Derwent), CNPAT (CN), JOPAL (JP)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP176022A, Brief	
A	EP0645143A1, Brief	
A	JP6263649A, Brief	
A	JP1066126A, Brief	

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

- | | |
|--|---|
| <p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim (S) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> | <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&" document member of the same patent family</p> |
|--|---|

Date of the actual completion of the international search
16 Oct. 2000 (16.10.2000)

Date of mailing of the international search report
26 OCT 2000 (26.10.00)

Name and mailing address of the ISA/CN The State Intellectual Property Office of the People's Republic of China
6 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District,
100088 Beijing, China

Authorized officer
Zhái Yu
Telephone No. 86-10-62093734...

Facsimile No. 86-10-62019451



国际检索报告

国际申请号

PCT/CN00/00205

A. 主题的分类: IPC (7): A61K35/78, 31/715, A61P35/00, 7/00, 31/12, 37/02, 43/00

按照国际专利分类表(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类体系和分类号)

IPC (7): A61K35/78, 31/715, A61P35/00, 7/00, 31/12, 37/02, 43/00

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献: 中国专利文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称和, 如果实际可行的, 使用的检索词)

WPI (Derwent), CNPAT (CN), JOPAL (JP)

C. 相关文件

类 型*

引用文件, 必要时, 指明相关段落

相关的权利要求编号

A JP9176002A, 摘要

A EP0645143A1, 摘要

A JP6263649A, 摘要

A JP1066126A, 摘要

☐ 其余文件在 C 栏的续页中列出。

☐ 见同族专利附件。

* 引用文件的专用类型:

"A" 明确叙述了被认为不是特别相关的一般现有技术的文件

"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先的申请或专利

"L" 可能引起对优先权要求的怀疑的文件, 为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件

"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

"P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

"T" 在申请日或优先权日之后公布的在后文件, 它与申请相抵触, 但是引用它是为了理解构成发明基础的理论或原理

"X" 特别相关的文件, 仅仅考虑该文件, 权利要求所记的发明就不能认为是新颖的或不能认为是有创造性

"Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 权利要求记载的发明不具有创造性

"&" 同族专利成员的文件

国际检索实际完成的日期
16.10.月 2000 (16.10.2000)

国际检索报告邮寄日期
26.10.00

国际检索单位名称和邮寄地址
中华人民共和国国家知识产权局
中国北京市海淀区西土城路 6 号(100088)

受权官员
翟羽

传真号: 86-10-62019451

电话号码: 86-10-62093734

